

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА

**ХАРЧЕНКО ВІТАЛІНА СЕРГІЇВНА**

УДК 577.115:577.175.72:612.67

**РОЛЬ СФІНГОЛІПІДІВ В МОДУЛЯЦІЇ ФОСФОЛІПАЗА Д-ЗАЛЕЖНОГО  
СИГНАЛІНГА ІНСУЛІНА В СТАРОСТІ**

03.00.04 - біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Харків - 2018

Дисертацією є рукопис  
Робота виконана в НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
**Бабенко Наталія Олексіївна,**  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, м. Харків

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Кучмеровська Тамара Муратівна,**  
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, м. Київ  
провідний науковий співробітник відділу біохімії вітамінів та коензимів

доктор біологічних наук, професор  
**Горбенко Наталія Іванівна,**  
Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків  
завідувачка лабораторії біохімічних досліджень

Захист відбудеться “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2019 року о \_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 64.051.17 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-26

З дисертацією можна ознайомитися в Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2018 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

М. К. Ковальова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** В процесі старіння зростає ризик виникнення метаболічних захворювань, зокрема ожиріння (Houston D., 2009), діабету 2 типу (Mozumdar A., 2011), нейродегенеративних патологій (Jové M., 2014). Порушення сигналіngu інсуліна є спільною рисою цих різних патологій (Schwartz M., 2013; Zeyda M., 2009; Akintola A., 2015). Сигнальні шляхи інсуліна тонко регулюють синтез мітохондріальної ДНК та білків, окисне фосфорилування, продукцію АТФ і антиоксидантну систему клітин, тому порушення регуляції сигнальних шляхів інсуліна асоційоване з дисфункціями мітохондрій, розвитком хронічних запальних процесів, що призводить до розвитку широкого спектру метаболічних захворювань (Kelley D., 2002; Lowell B., 2005). У клітинах-мішенях інсулін, активує рецептори і рецепторні тирозинкінази та індукує послідовну активацію сигнальних молекул: фосфатидилінозит-3-кінази (ФІЗ-кінази), Akt/протеїнкінази В (Akt/ПКВ), ARF, протеїнкінази С (ПКС) і таким чином регулює метаболізм глюкози (Taniguchi C., 2006). Нещодавно було показано, що в окремих типах клітин інсулін індукує активацію фосфоліпази Д (ФЛД) (Xu Y., 2011; Slaaby R., 2000). На культурі 3T3-L1 адипоцитів показано, що ФЛД бере участь в ключовому етапі індукованого інсуліном поглинання глюкози клітинами, а саме, в транслокації транспортерів глюкози (ГЛЮТ) з внутрішньоклітинних депо в плазматичну мембрану (Huang P., 2005; Xu Y., 2011). Експресія каталітично неактивної форми ФЛД-K898R в адипоцитах, а також використання антагоніста ФЛД (1-бутанола) або нового специфічного інгібітора ФЛД (5-флуоро-2-індол дес-хлорогалопеміда (FIPI)) призводять до блокування стимульованої інсуліном транслокації ГЛЮТ в клітинну мембрану і пригнічення поглинання глюкози клітинами (Huang P., 2005; Xu Y., 2011; Su W., 2009). Існують поодинокі дослідження щодо активації інсуліном ФЛД в гепатоцитах (Donchenko V., 1994) і синаптосомах кори головного мозку молодих статевозрілих щурів, проте механізми та функціональне значення його дії не встановлено (Giusto N., 2005). ФЛД, що гідролізує фосфатидилхолін (ФХ) до фосфатидної кислоти (ФК) і холіну, локалізується у внутрішніх компартментах клітин і в ліпідних рафтах плазматичної мембрани (Peng X., 2012). Фермент регулює процеси клітинного транспорту, реорганізації цитоскелета, ендоцитоза та екзоцитоза, міграції клітин і є критично важливим регулятором проліферації, виживання і трансформації клітин (Nelson R., 2015). Беручи до уваги важливу роль ФЛД у регуляції функцій клітин і поодинокі дані про активацію інсуліном ФЛД та участі ліпази в реалізації сигналу інсуліна, актуальним є дослідження функціональної ролі ФЛД у клітинах- і тканинах-мішенях дії інсуліна при старінні та експериментально-індукованих змінах ліпідного обміну клітин- і тканин-мішеней.

У старості та при розвитку стана інсулінорезистентності встановлено підвищення вмісту сфінголіпіда (СФЛ) цераміда в клітинах (Lightle S., 2000; Seo K., 2016; Park M., 2016; Rivas D., 2016). Показано, що екзогенний церамід пригнічує активність ключових учасників сигнальних шляхів інсуліна, таких як Akt/ПКВ, ARF і ПКС (Xia J., 2014). Також встановлено, що синтетичні аналоги цераміда можуть негативно регулювати ФЛД (Singh I., 2001; Gidwani H., 2003;

Abousalham A., 1997). СФЛ може пригнічувати активність ферменту прямими шляхами (на рівні транскрипції та шляхом конкуренції з кофакторами за активний центр) або опосередковано (змінюючи структуру мембранних ділянок – рафтів, де знаходиться ФЛД) (Singh I., 2001; Gidwani H., 2003; Abousalham A., 1997).

На теперішній час відсутні дані щодо впливу ендогенних церамідів на регуляцію інсуліном ФЛД у класичних (клітинах печінки і м'язовій тканині) і нових мішенях (неокортексі), на які діє гормон. Залишається також відкритим питання про те, які шляхи утворення СФЛ в старості призводять до їх накопичення в клітинах що є важливою ланкою в розвитку порушення чутливості клітин- та тканин-мішеней до дії гормонального стимулу. Зважаючи на це, актуальним є вивчення особливостей зміни вмісту СФЛ в тканинах-мішенях дії інсуліна в старості та їх впливу на вікові порушення функціонування ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано у відділі фізіології онтогенезу НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна в рамках науково-дослідної роботи «Роль ліпідів, які беруть участь у сигнальній трансдукції, в модулюванні процесу старіння» (державний номер реєстрації 0109U001577, здобувач – виконавець); «Роль метаболітів сфінгомієлінового циклу в розвитку резистентності клітин до дії фізіологічних стимулів у процесі старіння» (державний номер реєстрації 0111U010555, здобувач – виконавець); «Роль сфінгомієліназ у індукованої лікарськими препаратами резистентності клітин до дії інсуліна та тироксину в умовах передчасного старіння» (державний номер реєстрації 0115U000489, здобувач – виконавець).

**Мета та завдання досліджень.** Метою роботи було дослідити регуляцію та функціональне значення активації інсуліном ФЛД при зміні чутливості клітин і тканин-мішеней до дії інсуліна в старості.

Для реалізації поставленої мети були визначені такі завдання:

1. За допомогою інгібіторів ФІЗ-кінази та Akt/ПКВ, а також специфічного інгібітора ФЛД з'ясувати місце та значення активації ФЛД у сигнальному каскаді інсуліна та інсулін-індукованому поглинанні та накопиченні глюкози в гепатоцитах і неокортексі 3-місячних щурів.

2. Дослідити вікові особливості активації інсуліном ФЛД і поглинання глюкози в клітинах печінки, діафрагмі і неокортексі щурів 3-х і 24-місячного віку.

3. Оцінити вплив харчового раціону, збагаченого насиченими жирними кислотами на вміст СФЛ і активацію ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна в морфо-функціонально різних тканинах 3-місячних тварин.

4. Дослідити модулюючу дію попередників та індукторів утворення церамідів: пальмітинової кислоти (16:0), N-ацетил-D-сфінгозина (C2-цераміда), N-гексаноїл-D-сфінгозина (C6-цераміда), доксорубіцина (ДОХ) і паклітаксела на вміст сфінгомієліна та цераміда, активацію інсуліном ФЛД, поглинання глюкози і синтез глікогена в тканинах-мішенях дії інсуліна у молодих тварин.

5. З'ясувати вплив інгібіторів синтезу СФЛ і сфінгомієліназ (СФМаз) на вікові та експериментально індуковані зміни вмісту церамідів, активацію інсуліном ФЛД та метаболізм глюкози в тканинах- і клітинах-мішенях щурів різного віку.

**Об'єкт дослідження** – вікові особливості регуляції ФЛД інсуліном, моделювання змін активності ФЛД за допомогою аліментарних факторів, попередників та індукторів утворення та накопичення ендогенних керамідів, інгібіторів синтеза СФЛ і СФМаз.

**Предмет дослідження** – активація ФЛД, вміст кераміда, СФМ, [ $^3\text{H}$ ]глюкози і [ $^{14}\text{C}$ ]глікогена в клітинах печінки, діафрагмі та неокортексі щурів у старості, а також при моделюванні підвищеного вмісту керамідів *in vivo* за допомогою високожирової дієти або *in vitro* за допомогою індукторів синтеза і накопичення СФЛ (16:0, С2-кераміда, С6-кераміда, ДОХ і паклітаксела), і корекції даного стану інгібіторами синтеза СФЛ і СФМаз.

**Методи дослідження** – Методи клітинної біології (виділення та ізолювання гепатоцитів за методом Петренка і співавторів, визначення цілісності клітинних мембран гепатоцитів – тест з трипановим синім); біохімічні методи (визначення активності ФЛД та СФМаз, екстракція ліпідів за методом Bligh, Dyer, визначення білка за методом Lowry, кількісне визначення ліпідів за методами Bartlett та March, Weinstein), хроматографічні (розподіл ліпідних фракцій за допомогою тонкошарової хроматографії), радіоізотопні (включення мічених попередників до ліпідів та глікогена, поглинання міченої глюкози клітинами та тканинами), статистичні методи (аналіз отриманих даних).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Встановлено що, активація ФЛД в клітинах- і тканинах-мішенях, стимульованих інсуліном, асоціюється з посиленням поглинання глюкози і синтеза глікогена. Вперше показано, що стимульована інсуліном ФЛД контролюється ключовими учасниками сигнального каскаду інсуліна, а саме ФІЗ-кіназою, Akt/ПКВ, фосфатазою фосфатидної кислоти (ФФК), і при стимуляції клітин-мішеней інсуліном ФЛД активується після ФІЗ-кінази і Akt/ПКВ. Виявлено порушення передавання сигналу інсуліна через ФЛД-залежну ланку в старості в печінці, діафрагмі та неокортексі, яке супроводжується пригніченням процесів поглинання і запасання глюкози. Вперше встановлено, що моделювання підвищення вмісту ендогенних керамідів в печінці, діафрагмі і неокортексі молодих щурів за допомогою високожирової дієти, екзогенних 16:0, С2- та С6-керамідів, і індукторів утворення СФЛ, протипухлинних препаратів ДОХ і паклітаксела, призводить до порушення активації інсуліном ФЛД і процесів поглинання та запасання глюкози. Зниження вмісту ендогенних керамідів за допомогою специфічних інгібіторів синтеза СФЛ і СФМаз, супроводжується відновленням активації інсуліном ФЛД і посиленням процесів поглинання глюкози, як в старості, так і при моделюванні порушення чутливості клітин- і тканин-мішеней до інсуліна фармакологічними індукторами утворення керамідів. Таким чином, встановлена висока чутливість ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна до змін вмісту ендогенних керамідів в клітинах-мішенях.

**Практичне значення одержаних результатів.** Одержані дані про активацію ФЛД інсуліном і регуляції цього ферменту ключовими учасниками сигнального каскаду гормону ФІЗ-кіназою, Akt/ПКВ і ФФК розкривають раніше не вивчені аспекти сигнальної трансдукції інсуліна в клітинах печінки та неокортексі. Вплив активації інсуліном ФЛД на поглинання та запасання глюкози розширює класичні уявлення про реалізацію сигналу інсуліна, розкриває функціональне значення

активованої інсуліном ФЛД і надає нову терапевтичну мішень для пошуку шляхів подолання проблеми порушення чутливості клітин до дії гормональних стимулів. Отримані дані про пригнічення ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна і процесів обміну глюкози в старості поглиблюють уявлення про клітинні механізми розвитку вікової нечутливості клітин-мішеней до дії інсуліна. За допомогою модуляції вмісту СФЛ специфічними інгібіторами, які представляють собою затверджені лікарські засоби, встановлена оборотність цих процесів. Такий підхід до відновлення чутливості клітин і тканин-мішеней до дії інсуліна надає перспективи для пошуку нових підходів у подоланні вікових патологій, пов'язаних з порушенням чутливості до гормонального стимулу.

Результати дисертаційної роботи щодо регуляції ФЛД-залежної ланки сигнальної трансдукції інсуліна впроваджені в навчальний процес кафедри фізіології людини та тварини біологічного факультету у рамках спеціальних курсів: «Ендогенні модулятори фізіологічних функцій» та «Клітинні системи сигнальної трансдукції» для студентів 5-го курсу біологічного факультету за ОКР «Магістр» (впровадження підтверджено відповідним актом).

**Біоетична експертиза.** Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних Законів України. Комісією НДІ біології порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 8 від 20.10.2016 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Спільно з науковим керівником д.б.н, проф. Бабенко Н. О. обрано об'єкт і предмет дослідження, визначена мета, завдання і тема дисертаційної роботи і проведена інтерпретація отриманих результатів. Автор самостійно проведений аналіз наукової літератури, виконані експериментальні дослідження, проведена статистична обробка отриманих результатів, оформлення і підготовка матеріалів до публікації.

**Апробація результатів досліджень.** Матеріали досліджень були представлені та обговорені на VII, VIII і IX Міжнародних симпозиумах “Биологические механизмы старения” (Харьков, 2008, 2010, 2012), на науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Харків, 2008) та «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Харків, 2012, 2013, 2014), V національному конгресі патофізіологів України «Сучасні проблеми патофізіології від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів» (Запоріжжя, 2008), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Проблемні питання ендокринології у віковому аспекті» (Харків, 2009), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ендокринна патологія у віковому аспекті» (Харків, 2012), III International Symposium: Intracellular signaling and bioactive molecules design (Lviv, 2012), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2014).

**Публікації.** За темою дисертаційної роботи було опубліковано 24 наукових праці, з яких 11 статей (4 статті у виданнях, які входять до переліку наукових фахових видань України, 5 статей у виданнях, що входять до наукометричних баз,

1 стаття у вітчизняному журналі, 1 стаття в електронному журналі) та 13 тез доповідей в збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних з'їздів і конференцій.

**Структура й обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 219 сторінки, з них основного тексту 142 сторінки. Робота ілюстрована 53 рисунками. Список використаних джерел містить 349 найменувань.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**У вступі** обґрунтовано актуальність досліджуваної проблеми, наведено зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Сформульовано мету, завдання та методи дослідження. Визначено наукову новизну і практичне значення отриманих результатів. Надано відомості про публікації, особистий внесок здобувача та апробацію результатів дисертації.

**В огляді літератури** здійснено аналіз першоджерел щодо структури та функціональної ролі ФЛД в клітинах і тканинах ссавців, а також регуляції ферменту в різних клітинних процесах. Розглянуто інформацію щодо ролі ФЛД в сигнальній трансдукції інсуліна та регуляції гормоном процесів поглинання та запасання глюкози; особливостей сигнальної трансдукції інсуліна в клітинах- і тканинах-мішенях гормону. Проаналізовано наукові джерела щодо механізмів патологічного та вікового розвитку порушення чутливості клітин до дії гормонального стимулу та ролі в даних процесах цераміда.

**Матеріали та методи дослідження.** Експерименти виконані на 124 щурах-самцях лінії Вістар 3- і 24-місячного віку, яких утримували в стандартних умовах віварію Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Всі процедури з тваринами проводились з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів і інших наукових цілей (Страсбург, 1986) і національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001).

У першій серії експериментів вивчено особливості регуляції ФЛД в сигнальному каскаді інсуліна в гепатоцитах і неокортексі молодих 3-місячних щурів. Для цього з печінки інтактних тварин гепатоцити ізолювали неферментативним методом (Петренко А. та інш., 1991). Гепатоцити ресуспендували в середовищі 199 з 25 мМ HEPES. Мозок 3-місячних інтактних щурів швидко вилучали, неокортекс виділяли на льоду і обережно ресуспендували в Кребс-Рінгер бікаронатному буфері, що містив 118 мМ NaCl, 4,8 мМ KCl, 1,3 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1,2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 25 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 10 мМ глюкозу, 100 мкМ аскорбінову кислоту, 25 мМ HEPES. Гепатоцити і неокортекс інкубували 90 хв 37° С з [<sup>14</sup>C]16:0 (0,25 мкКі/мл) (або без неї) і інгібіторами ФІЗ-кінази (вортманін, LY294002), ФЛД (1-бутанол, галопемід), ФФК (пропранолол) і Akt/ПКВ (апігенін-7-глюкозид (АП7Гл), лютеолін-7-глюкозид (ЛЮ7Гл)).

Для вивчення впливу дієти з високим вмістом насичених жирів на активацію інсуліном ФЛД піддослідні тварини 2-місячного віку були розділені на 2 групи і протягом 5 тижнів отримували раціон різної калорійності. Щурів контрольної групи, утримували на стандартному раціоні віварію (загальна калорійність – 146,5 ккал; білки – 18,1 ккал; вуглеводи – 118,4 ккал; жири – 10,4 ккал). В іншій групі

калорійність раціону була збільшена на 21 % за рахунок додавання до стандартної дієти яловичого жиру (в якості джерела насичених жирів).

У другій серії експериментів з метою експериментального моделювання вікових порушень активації ФЛД-залежного ланки сигнального каскаду інсуліна клітини печінки і тканину діафрагми 3-місячних щурів, попередньо мічені [ $^{14}\text{C}$ ]16:0 (0,25 мкКі/мл) (або немічені), інкубували 90 хв 37 °С з попередниками синтеза і накопичення цераміда – 16:0 (0,75 мМ), або С2-цераміда (10 мкМ), або інгібітору синтеза цераміда *de novo* (міріюцина 5 мкМ) на тлі 16:0 або С2-цераміда. Для вивчення впливу екзогенних і ендогенних церамідів на стимульовану інсуліном активність ФЛД неокортекс 3-місячних щурів інкубували протягом 90 хв 37 °С у Кребс-Рінгер бікарбонатному буфері в присутності [ $^{14}\text{C}$ ]16:0 (0,25 мкКі/мл) і С2-цераміда (10 мкМ), або С6-цераміда (10 мкМ), або С6-цераміда (10 мкМ) і фумонізина В1 (1 мкМ), або неміченої 16:0 (0,75 мМ) або без них. Після закінчення інкубації шматочки тканини неокортекса відмивали буфером Кребса-Рінгера і ресуспендували в тому ж буфері. Попередньо мічені гепатоцити молодих тварин інкубували 90 хв 37 °С з протипухлинними препаратами – ДОХ (30 мМ) або паклітакселом (30 мМ) або з інгібіторами синтеза цераміда (міріюцином, фумонізином В1) і СФМаз (іміпраміном, GW4869) на тлі цитостатиків.

З метою пошуку шляхів корекції вікових порушень функціонування ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна в 3-й серії експериментів ізольовані гепатоцити і тканину неокортекса 24-місячних щурів інкубували в присутності міріюцина 5 мкМ, фумонізина В1 1 мкМ, або 50 мкМ іміпраміна, 20 мкМ GW4869, або суміші інгібіторів, або без них (як контроль) протягом 90 хв при 37 °С.

Для визначення активності ФЛД попередньо мічені [ $^{14}\text{C}$ ]16:0 м'язова тканина, неокортекс та гепатоцити відмивали буфером Кребса-Рінгера (для м'язової тканини і неокортекса) або Кребса-Хенселейта (для гепатоцитів), що містить 0,1 % БСА, і ресуспендували в тому ж буфері. Перед внесенням інсуліна в середовище інкубації м'язову тканину, неокортекс і гепатоцити попередньо інкубували в присутності 0,1 %-го етанолу або бутанолу протягом 10 хв, потім в середовище інкубації додавали 10 нМ інсулін або 0,9 %-ий NaCl (як контроль). Реакцію зупиняли через 5 або 30 хв сумішшю хлороформ:метанолу (1:2 за об'ємом).

Транспорт глюкози визначали з використанням 2-деокси- $^3\text{H}$ -D-глюкози (0,5 мкКі/мл) (Aga-Mizrachi S., 2008). Гепатоцити, діафрагму або неокортекс інкубували в буфері, що містить 20 мМ HEPES, 25 мМ глюкозу 30 хв. Після цього додавали 10 нМ інсулін (або 0,9 % NaCl, як контроль), 0,5 мкКі/мл 2-деокси- $^3\text{H}$ -D-глюкози і інкубували ще 10 хв при 37° С. Реакцію зупиняли крижаним 0,9 % NaCl. Клітини і тканини лізували 50 мМ NaOH.

Для вивчення утворення глікогена гепатоцити, шматочки діафрагми або неокортекса інкубували в буфері HBS з 5мМ глюкозою, 10 нМ інсуліном (або 0,9 % NaCl) і 1 мкКі/мл D-[ $^{14}\text{C}$ ]-глюкози інкубували 60 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли крижаним 0,9% NaCl. Клітини і тканини лізували 60 % КОН протягом 30 хв, потім до розчину додавали глікоген 1 мг/мл і кип'ятили 30 хв при 95° С. Осад двічі відмивали крижаним етанолом і розчиняли у воді.



Ліпіди з м'язової тканини, неокортекса і гепатоцитів екстрагували методом Bligh, Dyer (1959). Поділ ліпідів на фракції проводили методом тонкошарової хроматографії на сілікагелевих пластинках Sorbfil (Росія). У системах розчинників - етилацетат: ізооктан: оцтова кислота:  $\text{H}_2\text{O}$  (130: 20: 30: 100, за об'ємом) для фосфатидилетанолу (ФЕТ), або фосфатидилбутанола (ФБУТ); гексан: діетиловий ефір: оцтова кислота (73: 25: 2, за об'ємом) для діацилгліцеролу (ДАГ), вільних жирних кислот (ВЖК), триацілгліцеролу (ТАГ). Для поділу ФХ, фосфатидилетанолу (ФЕА), цераміда і сфінгомієліну (СФМ) використовували системи: діетиловий ефір (система 1) і хлороформ: метанол:  $\text{H}_2\text{O}$  (40: 10: 1, за об'ємом) (система 2). Плями ліпідів проявляли в парах йоду. Радіоактивність проб вимірювали за допомогою лічильника БЕТА («Медприбор», Київ).

Аналіз отриманих даних проведено методами варіаційної статистики. Перевірку нормальності розподілу даних було здійснено за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Порівняння двох груп даних було здійснено за допомогою t-критерію Стюдента. Для множинних порівнянь було використано однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA, критерій Ньюмена-Кейлса, критерій Даннета). Результати подано у вигляді  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  (середнє арифметичне ( $\bar{x}$ ), стандартна похибка середнього арифметичного ( $s_{\bar{x}}$ )). Розходження між даними вважали статистично значущими, якщо  $p \leq 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

**Регуляція ФЛД у сигнальному каскаді інсуліна в клітинах печінки.** Встановлено, що внесення інсуліна в середовище інкубування клітин печінки, м'язової тканини або неокортекса статистично значимо збільшує активність ФЛД. Інсулін стимулює продукцію [ $^{14}\text{C}$ ]ФЕТ і зниження вмісту субстрату ФЛД, [ $^{14}\text{C}$ ]ФХ у вивчених тканинах, мічених [ $^{14}\text{C}$ ]16:0 (рис. 1).

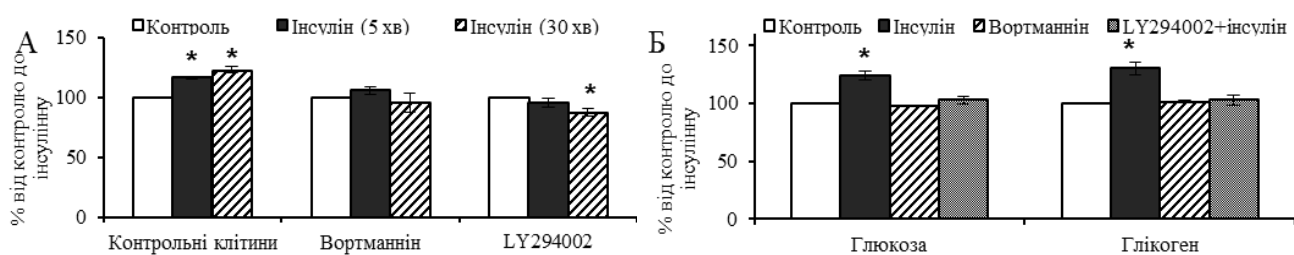


Рис. 1 Вплив інгібіторів ФІЗ-кінази (вортманіна і LY294002) на активацію інсуліном ФЛД (А), поглинання глюкози і синтез глікогена (Б)

Примітки. \* - статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl),  $p < 0,05$

Внесення вортманіна або LY294002 в середовище інкубування гепатоцитів нівелює стимулюючий ефект інсуліна на продукцію [ $^{14}\text{C}$ ]ФЕТ, поглинання [ $^3\text{H}$ ]глюкози і синтез [ $^{14}\text{C}$ ]глікогена (рис. 1).

Для подальшого вивчення участі ФЛД у сигналінгу інсуліна в клітинах печінки, ми використовували специфічний інгібітор ФЛД, галопемід (Scott S. et al., 2014) і антагоніст ФЛД, церамід (Pasquaré S., 2011; Arana L., 2010).

Попередня обробка гепатоцитів галопемідом нівелювала стимулюючу дію інсуліна на активність ФЛД і пригнічувала індукцію поглинання глюкози і синтезу глікогена інсуліном (рис. 2).

Внесення в середовище інкубації екзогенного С6-цераміда, який вибірково знижує активність і експресію ФЛД1 (Mebarek S., 2007), редукувало базальну активність ФЛД, поглинання глюкози і синтез глікогена (рис. 2).

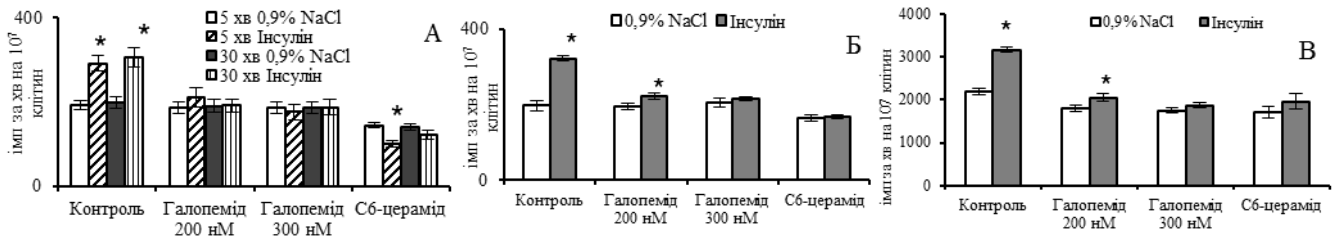


Рис. 2 Вплив галопеміду і С6-цераміда на стимульовану інсуліном активацію ФЛД (А), поглинання глюкози (Б) і синтез глікогена (В)

Примітка. \* - статистично значимо у порівнянні з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl),  $p \leq 0,05$

На наступному етапі було вивчено вплив флавонів, лютеоліна і апігеніна, на ФЛД-залежний сигналінг інсуліна в первинній культурі гепатоцитів. Лютеолін, апігенін і їх глікозилізовані форми є модуляторами сигнальних шляхів інсуліна в клітинах-мішенях. Флавори інгібують стимульовані інсуліном фосфорилювання/активацію Akt/ПКВ, транслокацію ГЛЮТ4 в плазматичну мембрану і поглинання глюкози (Nomura M., 2008; Bumke-Vogt C., 2014). Ми вивчили вплив ЛЮ7Гл і АП7Гл на активність ФЛД, поглинання глюкози і синтез глікогена в гепатоцитах щурів, стимульованих інсуліном. З огляду на те, що лютеолін пригнічує стимульоване інсуліном фосфорилювання  $\beta$ -субодиниці рецептора інсуліна, а апігенін має тільки тенденцію до пригнічення фосфорилювання інсулінового рецептора (Bumke-Vogt C., 2014), доцільним було провести експерименти двох типів: (1) флавори додавали в інкубаційне середовище перед інсуліном; (2) флавори додавали після внесення інсуліна. Тест з трипановим синім не показав порушення проникності мембран гепатоцитів при дії ЛЮ7Гл або АП7Гл. Ці результати узгоджуються з роботами раніше проведеними на гепатоцитах, оброблених ЛЮ7Гл або АП7Гл (Babenko N., Shakhova E., 2006; 2008). Внесення флавонів в інкубаційне середовище гепатоцитів перед інсуліном або після нього, супроводжувалося зниженням індукованої інсуліном активності ФЛД, а також поглинання глюкози і синтезу глікогена в клітинах щурів, в той час як флавори не змінювали активність ФЛД і метаболізм глюкози в нестимульованих клітинах.

Таким чином, встановлено, що інсулін активує ФХ-специфічну ФЛД як у клітинах печінки і м'язах, так і в неокортексі, і цей процес асоційовано з посиленням поглинання глюкози і синтезу глікогена. Активація інсуліном сигнального шляху ФЛД/ФК блокується специфічними інгібіторами ФІЗ-кінази, що вказує на активацію ФЛД інсуліном у сигнальному каскаді після ФІЗ-кінази. Зміни в інсулін-стимульованій активності ФЛД індуковані АП7Гл/ЛЮ7Гл дозволяють припустити,

що ФЛД активується в сигнальному каскаді після Akt/ПКВ. Регуляція ФЛД і метаболізму глюкози інсуліном у первинних гепатоцитах є чутливою до антагоніста ФІЗ-кіназа/Akt/ПКВ-сигнальних шляхів цераміда. Активація ФЛД і метаболізм глюкози, в стимульованих інсуліном клітинах можуть бути значно пригнічені екзогенним С6-церамідом. Використання галопеміда пригнічує активність ФЛД і стимуляцію поглинання глюкози і синтеза глікогена інсуліном у гепатоцитах. Таким чином, ФЛД відіграє важливу роль у сигналінгу інсуліна. ФЛД, що активується після ФІЗ-кіназа/Akt/ПКВ, є чутливою до вмісту цераміда в гепатоцитах. Модуляція активності ФЛД за допомогою специфічних інгібіторів може бути зручним інструментом для зміни чутливості клітин до дії інсуліна.

**Регуляція ФЛД в сигнальному каскаді інсуліна в мозку.** За допомогою специфічних інгібіторів ФІЗ-кінази і ФЛД вивчали ФЛД-залежну регуляцію інсуліном метаболізму глюкози в неокортексі дорослих тварин. Встановлено, що внесення вортманіна або LY294002 в інкубаційне середовище тканини неокортекса нівелює стимулюючий ефект інсуліна на продукцію [ $^{14}$ C]ФЕТ ФЛД, а також на поглинання [ $^3$ H]глюкози. Встановлено, що внесення галопеміда в середовище інкубації тканини неокортекса молодих щурів, попередньо міченої [ $^{14}$ C]16:0, запобігає накопиченню [ $^{14}$ C]ФЕТ при стимулюванні нервової тканини інсуліном (рис. 3). Крім того, галопемід також редукує стимульоване інсуліном поглинання глюкози тканиною неокортекса (рис. 3).

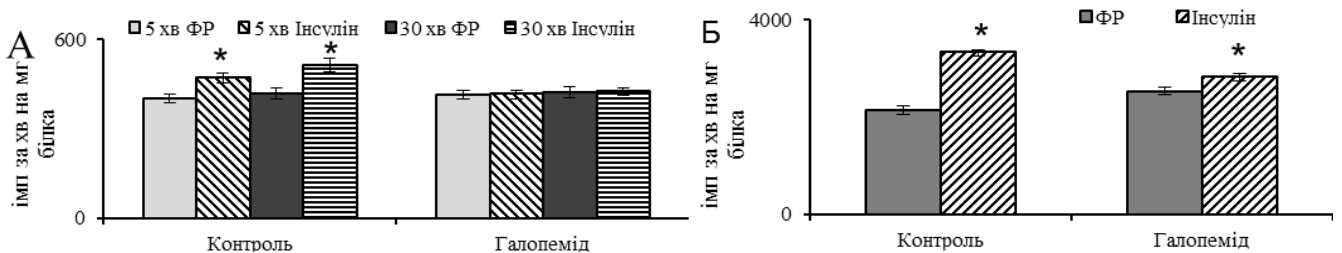


Рис. 3 Вплив галопеміда на активацію ФЛД (А) і на індукцію інсуліном поглинання глюкози (Б) в неокортексі щурів 3-місячного віку

Примітка: \* - статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl),  $p \leq 0,05$

Церамід є інгібітором ФЛД, а також пригнічує ряд ключових молекул сигнального каскаду інсуліна в периферичних тканинах. Так, у неокортексі молодих щурів синтетичний С6-церамід запобігає стимулюванню інсуліном активації ФЛД і поглинання глюкози (рис. 4).

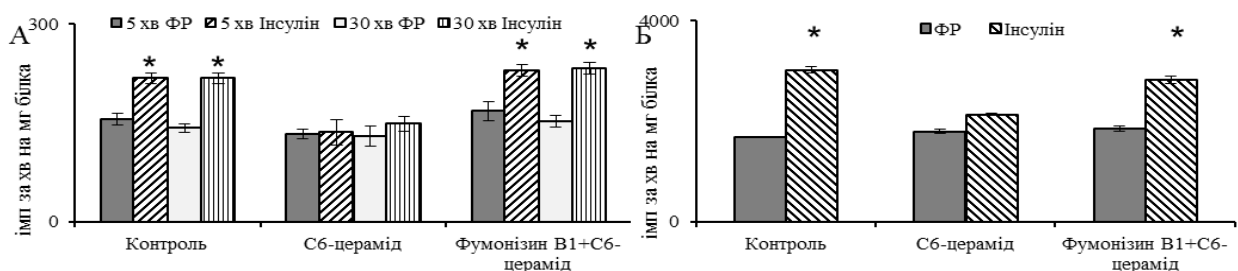


Рис. 4 Вплив екзогенного С6-цераміда і фумонізіна В1 на активацію інсуліном ФЛД і поглинання глюкози в неокортексі 3-місячних щурів

Примітка: \* - статистично значимо в порівнянні з 0,9 % NaCl,  $p \leq 0,05$

Інкубування тканини неокортекса щурів в присутності фумонізина В1 нівелює інгібуючу дію С6-цераміда на агоніст-стимульовану активацію ФЛД і поглинання глюкози (рис. 4).

Встановлено, що С6-церамід посилює включення міченої [ $^{14}\text{C}$ ]16:0 в ендogenousні цераміди неокортекса щурів, про що свідчить підвищення вмісту [ $^{14}\text{C}$ ]цераміда ( $241,5 \pm 15,5$  (імп за хв на мг білка) в контролі в порівнянні з  $364,4 \pm 21,4$  в досліді,  $p \leq 0,05$ ). Інкубація тканини неокортекса в присутності інгібітора синтезу церамідів *de novo*, фумонізина В1, запобігає індукції С6-церамідом накопичення мічених ендogenousних церамідів –  $247,1 \pm 3,7$  імп за хв на мг білка.

Таким чином, активація інсуліном транспорту глюкози в мозку визначена послідовною активацією ФІЗ-кінази і ФЛД. Інсулін-залежна регуляція ФЛД у мозку чутлива до дії ендogenousного модулятора сигналіngu інсуліна – цераміда. Поруху синаліngu інсуліна, що викликане накопиченням цераміда в неокортексі, можна запобігти за допомогою пригнічення синтезу цераміда *de novo*.

**Вікові і експериментально індyковані зміни регуляції інсуліном ФЛД у клітинах і тканинах-мішенях.** Встановлено, що в гепатоцитах 24-місячних щурів при короткостроковій стимуляції клітин інсуліном відбувається зміна вмісту ФЕТ і ФХ відмінне від такого у молодих 3-місячних тварин. Відзначено достовірне зниження вмісту ФЕТ на 5 хв інкубації з інсуліном та відсутність змін після 30 хв впливу гормону. Встановлено, що інкубація тканини діафрагми та неокортекса 24-місячних тварин у присутності інсуліна протягом 5 хв і 30 хв не супроводжується статистично значущими змінами вмісту продукту – ФЕТ і субстрату – ФХ. Таким чином, в старості відбувається порушення активації ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна в клітинах печінки, діафрагми і неокортексі.

**Вплив екзogenousних 16:0 і С2-цераміда на активацію інсуліном ФЛД в клітинах і тканинах-мішенях.** Підвищення з віком продукції і накопичення цераміда може бути змодельоване в різних типах клітин за допомогою збільшення вмісту в середовищі культивування попередника СФЛ – 16:0 або С2-цераміда (Holland W., 2007; Konstantynowicz-Nowicka K., 2015; Blázquez C., 2000; Chabowski A., 2013). С2-церамід легко проникає в клітини та підвищує вміст ендogenousних церамідів.

Встановлено, що інкубація тканини діафрагми з екзogenousною 16:0 викликає підвищення вмісту [ $^{14}\text{C}$ ]цераміда на 77 % і зниження вмісту [ $^{14}\text{C}$ ]СФМ на 16 % в порівнянні з контрольними зразками. Інкубація діафрагми 3-місячних інтактних щурів з екзogenousним С2-церамідом викликала підвищення вмісту [ $^{14}\text{C}$ ]цераміда на 74 % і зниження вмісту [ $^{14}\text{C}$ ]СФМ на 34 % в порівнянні з контролем. В діафрагмі, після впливу на неї екзogenousного С2-цераміда, інсулін не підвищує вміст [ $^{14}\text{C}$ ]ФЕТ і не знижує рівень [ $^{14}\text{C}$ ]ФХ, що свідчить про пригнічення активності ФЛД.

Інкубування гепатоцитів молодих щурів у присутності підвищеної концентрації 16:0 або екзogenousного С2-цераміда призводить до підвищення вмісту в клітинах ендogenousних церамідів. Екзogenousні 16:0 і С2-церамід пригнічують індyкцію інсуліном утворення [ $^{14}\text{C}$ ]ФЕТ, що свідчить про блокування стимуляції гормоном ФЛД за даних умов експерименту.

Для з'ясування ролі церамідів у віковому порушенні активації інсуліном ФЛД у неокортексі щурів вивчали зміни вмісту ФЕТ в неокортексі 3-місячних щурів в

умовах підвищеного під дією 16:0 або С2-цераміда вмісту ендogenous церамідів. Введення в культуральне середовище астрогліальних клітин 16:0 посилює процес синтеза СФЛ і цераміда *de novo* (Patil S., 2008). У даній роботі інкубація тканини неокортекса в присутності 16:0 призводить до підвищення вмісту і ВЖК, і цераміда. Встановлено, що в умовах інкубації неокортекса 3-місячних щурів за наявності 16:0 або С2-цераміда відбувається пригнічення утворення ФЕТ у відповідь на короткочасну стимуляцію тканини неокортекса інсуліном.

Таким чином, встановлено, що експериментально індуковані зміни вмісту СФЛ супроводжуються нівелюванням активації ФЛД при короткочасному впливі інсуліна у вивчених тканинах і клітинах-мішенях гормону.

**Вплив фармакологічних індукторів накопичення цераміда на активацію інсуліном ФЛД у клітинах- і тканинах-мішенях.** Наступним етапом дослідження стало моделювання підвищеного вмісту цераміда за допомогою протипухлинного препарату паклітаксела. В старості підвищення вмісту цераміда може бути пов'язано з різними шляхами його утворення, а саме синтеза *de novo* або гідролізу СФМ СФМазами. Для моделювання вікових змін вмісту СФЛ гепатоцити культивували в присутності паклітаксела. Паклітаксел може індукувати синтез цераміда та підвищувати в клітинах СФМазну активність (Asakuma J., 2003). Встановлено, що в результаті дії паклітаксела в клітинах печінки відбувається підвищення вмісту цераміда в 4,7 рази в порівнянні з контрольними клітинами (рис. 5).

Підвищення вмісту цераміда в гепатоцитах 3-місячних щурів після інкубації клітин за наявності паклітаксела супроводжується порушенням індукованого інсуліном утворення [ $^{14}\text{C}$ ]ФЕТ (рис. 5), продукту реакції, яку каталізує ФЛД, що свідчить про пригнічення активації ФЛД.

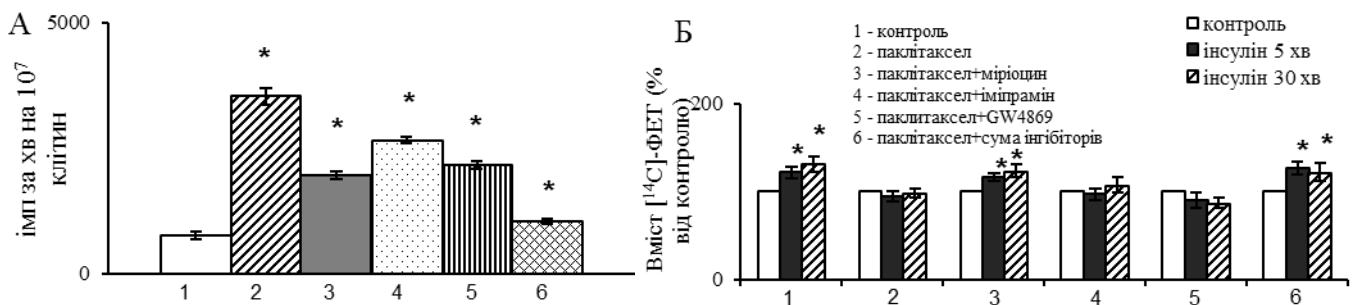


Рис. 5 Вплив паклітаксела і інгібіторів синтезу СФЛ і СФМаз на вміст цераміда (А) і індукцію інсуліном активації ФЛД (Б) в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. \* - статистично значимо в порівнянні з контролем,  $p < 0,05$

Ще одним індуктором обміну СФЛ є ДОХ. Він індукує накопичення цераміда в гепатоцитах щурів (Martínez R. et al., 2009) та інших типах клітин (Dumitru C., 2007; Rath G., 2009). Більш того, ДОХ може знижувати експресію генів IRS1, Glut4, AMPK, і GSK3b в м'язовій тканині і викликати системну інсулінорезистентність (de Lima V., 2015), призводячи до розвитку стану подібного до діабету 2 типу (Arunachalam S., 2013). Для вивчення ефектів ендogenous цераміда на стимуляцію ФЛД інсуліном, гепатоцити було оброблено ДОХ до внесення гормону в культуральне середовище. ДОХ достовірно збільшує рівень цераміда в не

стимульованих клітинах і нівелює стимулюючу дію інсуліна на активність ФЛД (рис. 6).

Інгібування ключових ферментів синтеза СФЛ (СПТ 1) і деградації СФМ (нейтральної і кислої СФМаз) при дії специфічних інгібіторів, міріюцина (Wadsworth J., 2013), GW4869 (Luberto C., 2002), і іміпраміна (Kornhuber J., 2010), частково запобігає накопиченню керамідів в гепатоцитах оброблених ДОХ (рис. 6А). Вміст керамідів у гепатоцитах може бути знижено при використанні всіх інгібіторів обміну СФЛ. Нормалізація рівня керамідів у ДОХ-оброблених клітинах за допомогою "суми" інгібіторів відновлювала відповідь гепатоцитів на дію інсуліна. Додавання всіх інгібіторів ключових ферментів синтеза або продукції кераміда зі СФМ в середовище інкубації клітин посилювало активацію ФЛД (рис. 6Б).

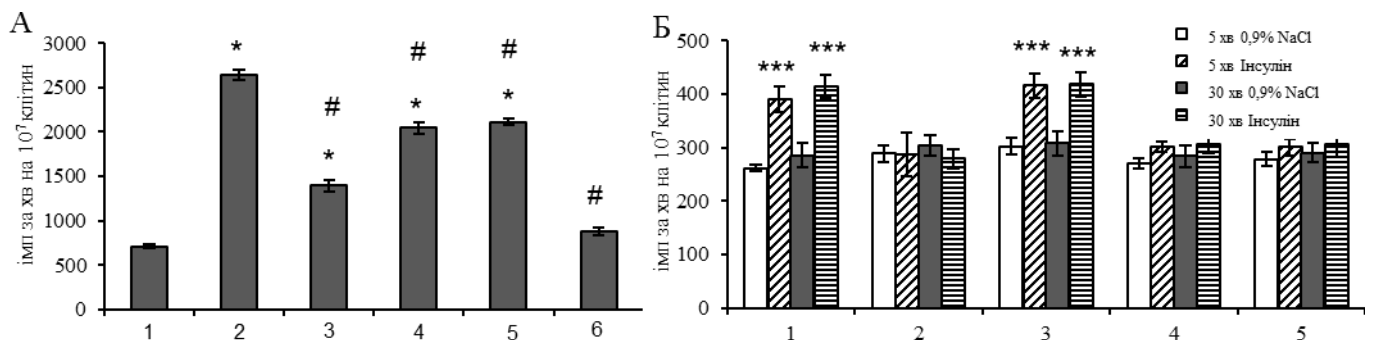


Рис. 6 Вплив ДОХ і інгібіторів синтеза СФЛ і СФМазної активності на вміст кераміда (А) і індуковану інсуліном активацію ФЛД (Б) в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітки: \* - статистично значимо щодо контролю до ДОХ (0,9 % NaCl),  $p \leq 0,05$ ; # - статистично значимо щодо ДОХ,  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* - статистично значимо щодо контролю до інсуліна,  $p \leq 0,05$ . Рис. 6А: 1 – Контроль; 2 – ДОХ; 3 – ДОХ+міріюцин; 4 – ДОХ+GW4869; 5 – ДОХ+іміпрамін; 6 – ДОХ+сума інгібіторів. Рис. 6Б: 1 - Контроль; 2 - ДОХ; 3 - ДОХ+сума інгібіторів; 4 - ДОХ+сума інгібіторів + галопемід 200 нМ; 5 - ДОХ+сума інгібіторів+галопемід 300 нМ

Таким чином, встановлено що, 16:0 і С2-церамід підвищують в клітинах вміст кераміда за рахунок активації його синтеза *de novo*. Паклітаксел і ДОХ посилюють утворення кераміда шляхом синтеза, або за рахунок активації СФМаз. Індуктори утворення кераміда призводять до пригнічення ФЛД-залежної ланки сигнального шляху інсуліна за рахунок підвищення концентрації СФЛ в клітинах. Використання інгібіторів синтеза СФЛ і СФМаз показало, що саме знов синтезований керамід пригнічує ФЛД-залежну ланку сигнального шляху інсуліна при моделюванні стана резистентності в клітинах печінки молодих щурів за допомогою попередників керамідів (16:0 і С2-цераміда) і індукторів накопичення керамідів протипухлинних препаратів – ДОХ і паклітаксела.

**Вікові особливості стимульованого інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена в клітинах- і тканинах-мішенях.** Встановлено, що в діафрагмі 3-місячних щурів інсулін стимулює поглинання глюкози з  $1622,1 \pm 120,1$  до  $2441,6 \pm 187,1$  імп за хв на мг білка. Тоді як у 24-місячних щурів в діафрагмі не

визначено статистично значущих змін вмісту міченої глюкози. Крім того, в діафрагми 3-місячних щурів під дією інсуліна посилюється утворення глікогена з  $3022,1 \pm 180,8$  до  $4262,2 \pm 178,4$  імп за хв на мг білка. У 24-місячних тварин інсулін не викликає статистично значущих змін вмісту міченого глікогена в діафрагмі.

Встановлено, що в клітинах печінки 3-місячних щурів інсулін стимулює поглинання глюкози з  $236,9 \pm 7,9$  до  $381,9 \pm 10,1$  (імп за хв на  $10^7$  клітин) після стимулювання інсуліном. Крім того, інсулін підсилює утворення глікогена гепатоцитами молодих тварин з  $1166,23 \pm 111,5$  до  $2086 \pm 269,7$  (імп за хв на  $10^7$  клітин). У той же час, у 24-місячних щурів інсулін не стимулює в клітинах процесів поглинання глюкози і утворення глікогена.

Встановлено, що в неокортексі 3-місячних щурів інсулін стимулює процеси обміну глюкози. Так, при інкубації ізольованих шматочків тканини неокортекса в присутності інсуліна відзначено посилення поглинання міченої [ $^3\text{H}$ ]глюкози на 41 % і підвищення вмісту [ $^{14}\text{C}$ ]глікогена на 50 %. У 24-місячних тварин у шматочках тканини неокортекса у відповідь на дію інсуліна не було відмічено статистично значущих змін рівня [ $^3\text{H}$ ]глюкози і вмісту [ $^{14}\text{C}$ ]глікогена.

**Вплив екзогенних 16:0 і С2-цераміда на регуляцію інсуліном метаболізму глюкози в клітинах- і тканинах-мішенях.** При дослідженні регуляції інсуліном обміну глюкози за моделювання стана порушення чутливості до дії інсуліна в діафрагмі, клітинах печінки і неокортексі щурів були використані екзогенні індуктори синтеза СФЛ – 16:0 і С2-церамід.

Встановлено, що в діафрагмі 16:0 пригнічує стимульоване інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена (рис. 7). Виявлено, що С2-церамід інгібував в тканині, стимульоване інсуліном поглинання глюкози і синтез глікогена.

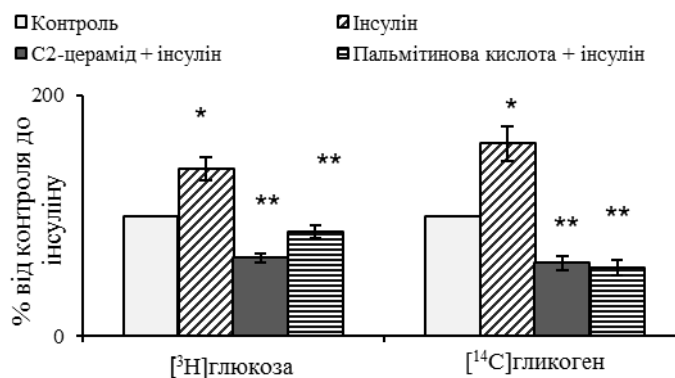


Рис. 7 Вплив 16:0 і С2-цераміда на індуковане інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена в діафрагмі 3-місячних щурів

Примітки: 1) \* - статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl),  $p < 0,05$ ; 2) \*\* - статистично значимо щодо «інсуліна»,  $p < 0,05$

При моделюванні порушення чутливості клітин печінки до дії інсуліна за допомогою інкубації гепатоцитів молодих щурів у присутності підвищеної концентрації 16:0 або екзогенного С2-цераміда встановлено зростання вмісту в клітинах ендогенних церамідів. Екзогенні 16:0 і С2-церамід пригнічували стимуляцію інсуліном ФЛД за даних умов експерименту. Як 16:0, так і екзогенний С2-церамід, перешкоджають стимуляції інсуліном поглинання глюкози і синтезу

глікогена в гепатоцитах молодих тварин (рис. 8). Отримані дані свідчать про порушення чутливості гепатоцитів молодих щурів до дії інсуліна в умовах інкубації клітин за наявності 16:0 і С2-цераміда.

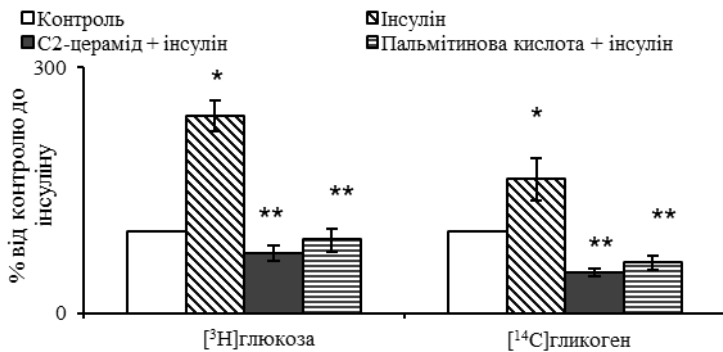


Рис. 8 Вплив 16:0 і С2-цераміда на індуковане інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена в клітинах печінки 3-місячних щурів

Примітки: 1) \* - статистично значимо щодо контролю,  $p < 0,05$ ; 2) \*\* - статистично значимо щодо «інсуліна»,  $p < 0,05$

З метою моделювання стану порушення чутливості тканини неокортекса до дії інсуліна подібне до того, яке спостерігається при старінні, на наступному етапі роботи було вивчено вплив екзогенних 16:0 або С2-цераміда на інсулін-залежне поглинання глюкози і утворення глікогена в тканині неокортекса 3-місячних щурів. Інкубація неокортекса молодих щурів у присутності екзогенної 16:0 пригнічує поглинання глюкози на 67 % в порівнянні з гормоном (рис. 9). Під дією С2-цераміда виявлено зниження рівня поглинання глюкози на 71 % в порівнянні з інсуліном. У той же час, при інкубації тканини неокортекса в присутності 16:0 або С2-цераміда встановлено пригнічення стимульованого інсуліном утворення глікогена нервовою тканиною (рис. 9).

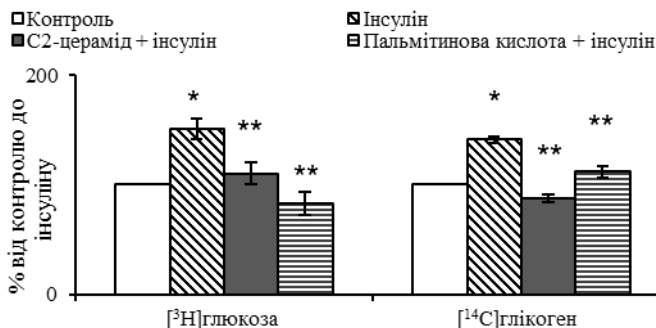


Рис. 9 Вплив 16:0 і С2-цераміда на індуковане інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена в неокортексі 3-місячних щурів

Примітки: 1) \* - статистично значимо щодо контролю,  $p < 0,05$ ; 2) \*\* - статистично значимо щодо «інсуліна»,  $p < 0,05$

З огляду на те, що глюкоза відіграє важливу роль у функціонуванні всіх вивчених тканин і процеси поглинання і запасання глюкози є мішенню дії церамідів, можна припустити, що пригнічення інсулін-залежного обміну глюкози може бути важливою причиною порушення функціонування клітин-мішеней інсуліна в старості і передувати розвитку різних патологій.

**Вплив фармакологічних індукторів накопичення цераміда на регуляцію інсуліном метаболізму глюкози в клітинах- і тканинах-мішенях.** Показано, що обмін СФЛ посилюється в печінці у старих щурів порівнянно з молодими (Kavok N., 2003) і структурах мозку (стриатумі, гіпокампі і фронтальній корі великих півкуль) (Crivello N., 2005; Babenko N., 2010). Накопичення цераміда в старості в печінці і гепатоцитах супроводжується зниженням вмісту СФМ і посиленням активності кислої і нейтральної СФМаз (Lightle S., 2000; Babenko N., 2006). Паклітаксел і ДОХ є цитотоксичними препаратами, які індукують



накопичення кераміда в клітинах як шляхом синтеза *de novo*, так і через СФМазі (Asakuma J., 2003). На даному етапі роботи встановлено пригнічення інсулін-стимульованого поглинання глюкози під дією паклітаксела (рис. 10).

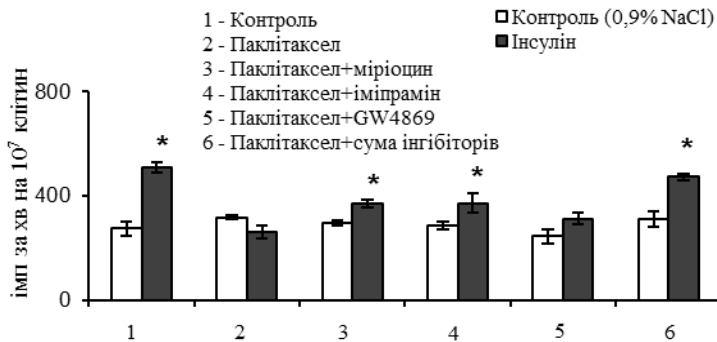


Рис. 10 Вплив паклітаксела, інгібіторів синтезу СФЛ і СФМаз на індуковане інсуліном поглинання глюкози в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка: \* - статистично значимо щодо контролю до інсуліна,  $p \leq 0,05$

При сумісній дії паклітаксела з міріюцином або іміпраміном спостерігається посилення поглинання глюкози клітинами печінки на 25 % і 29 %, відповідно, в порівнянні з контролем до інсуліна. Сумісна дія інгібіторів запобігає пригніченню паклітакселом інсулін-залежного поглинання глюкози в гепатоцитах молодих щурів.

Нормалізація рівня керамідів у ДОХ-оброблених клітинах за допомогою суміші інгібіторів супроводжувалася відновленням відповіді гепатоцитів на дію інсуліна. У попередньому розділі встановлено, що внесення міріюцина, GW4869, іміпраміна в середовище інкубації гепатоцитів посилювало активацію ФЛД.

Внесення інгібіторів обміну СФЛ в середовище інкубації клітин печінки запобігало ДОХ-індукованому пригніченню поглинання [ $^3\text{H}$ ]глюкози під дією інсуліна в гепатоцитах (рис. 11)

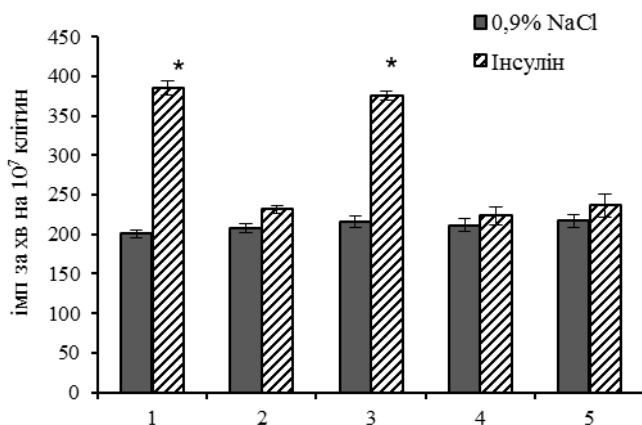


Рис. 11 Вплив ДОХ, інгібіторів обміну СФЛ і галопеміда на індуковане інсуліном поглинання глюкози в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітки: 1) 1 - Контроль; 2 - ДОХ; 3 - ДОХ+сума інгібіторів; 4 - ДОХ+сума інгібіторів+галопемід 200 нМ; 5 - ДОХ+сума інгібіторів+галопемід 300 нМ; 2) \* - вірогідно щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl),  $p \leq 0,05$

Більш того, інгібування активності ФЛД за допомогою специфічного інгібітора, галопеміда, що передує фармакологічному пригніченню регуляції рівня кераміда в клітинах, пригнічує стимульоване інсуліном поглинання глюкози. Ці результати підтверджують і розширюють уявлення про важливу роль ФЛД у регуляції метаболізму глюкози в первинній культурі гепатоцитів, стимульованих інсуліном.

**Вплив інгібіторів синтезу СФЛ і СФМаз на активацію інсуліном ФЛД і регуляцію метаболізму глюкози.** СФЛ відіграють важливу роль в розвитку резистентності клітин-мішеней до дії інсуліна. Модуляція вмісту СФЛ в тканинах-мішенях дії інсуліна в умовах *in vivo* та в експериментах на культурах клітин супроводжується зміною їх чутливості до дії гормону. Тому важливо було дослідити

дію специфічних інгібіторів синтеза і деградації СФМ і кераміда на здатність старих клітин відповідати на дію інсуліна.

Встановлено, що в гепатоцитах 24-місячних щурів інсулін не викликає статистично значущих змін у поглинанні міченої глюкози і утворенні глікогена клітинами порівнянно з гепатоцитами 3-місячних щурів (рис. 12). Внесення в середовище інкубації клітин печінки старих тварин інгібітора СПТ 1 міріюцина і інгібітора кислоти СФМазі іміпраміна супроводжувалося частковим відновленням інсулін-залежного поглинання міченої глюкози. При внесенні в середовище інкубації клітин печінки суміші інгібіторів встановлено підвищення поглинання глюкози на 90 % в порівнянні з інтактними 24-місячними гепатоцитами. Ця зміна склала 76 % від рівня поглинання глюкози гепатоцитами 3-місячних щурів. Інгібування синтеза кераміда *de novo* шляхом фармакологічного пригнічення СПТ 1 може запобігати інсулінорезистентності, що викликана кортикостероїдами, насиченими жирами і в генетичній моделі ожиріння (Holland W., 2007).

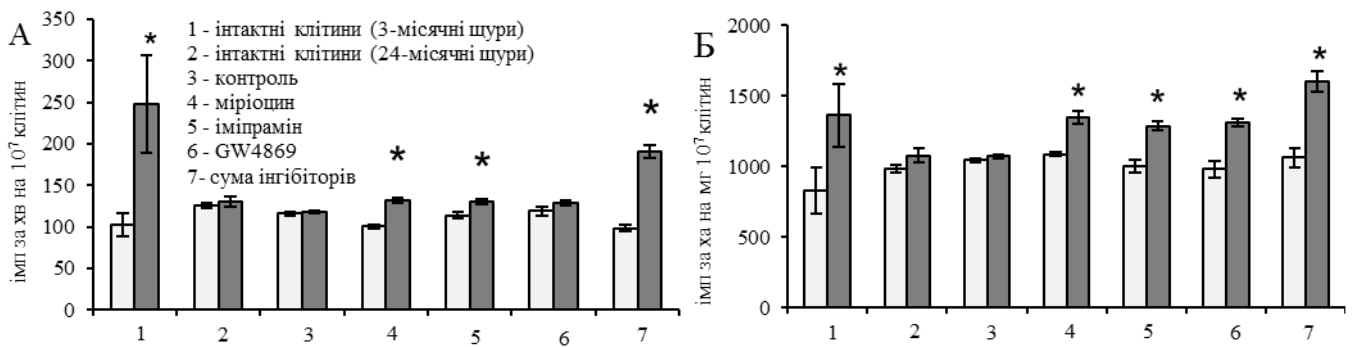


Рис. 12 Вплив міріюцина, іміпраміна, GW4869 і суми інгібіторів на інсулін-залежне поглинання глюкози (А) і утворення глікогена (Б) гепатоцитами 24-місячних щурів

Примітки: 1) білі колонки – контроль до інсуліна (0,9 % NaCl), темно-сірі колонки – інсулін; 2) \* - статистично значимо в порівнянні з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl),  $p \leq 0,05$

З метою з'ясувати, які шляхи утворення ендогенних керамідів у неокортексі задіяні в старості були використані специфічні інгібітори синтеза СФЛ і СФМаз. Встановлено, що в неокортексі старих щурів статистично значимо знижують вміст кераміда – міріюцин, GW4869. Іміпрамін не впливає на вміст кераміда в неокортексі старих тварин. В той же час, максимальний ефект на рівень керамідів спостерігали за сумісною дією інгібіторів (рис. 13).

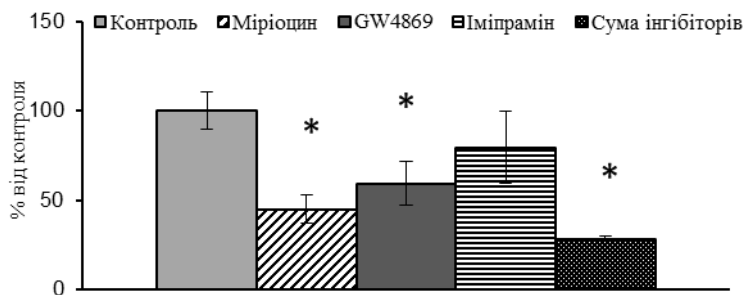


Рис. 13 Вплив інгібіторів синтеза СФЛ на вміст керамідів в неокортексі щурів 24-місячного віку

Примітка: \* - статистично значимо в порівнянні з контролем,  $p \leq 0,05$

Показано, що в клітинах печінки 24-місячних тварин ФЛД-залежна ланка сигнального каскаду інсуліна не активується у відповідь на дію гормону (Babenko N., 2012). Внесення в середовище інкубації гепатоцитів старих щурів інгібіторів обміну СФЛ відновлює відповідь клітин на дію інсуліна (Babenko N., 2012).

Інкубування тканини неокортекса 24-місячних щурів за наявності міріюцина, GW4869 і суми всіх інгібіторів відновлює стимулювання інсуліном активації ФЛД в порівнянні з контрольною тканиною (рис. 14). Інкубація тканини неокортекса 24-місячних щурів за наявності міріюцина або GW4869 практично не впливає на зміни базального рівня стимульованого інсуліном поглинання глюкози (рис. 14). Міріюцин підвищує стимульований інсуліном рівень поглинання глюкози на 50 % в порівнянні з контрольною тканиною. GW4869 збільшує поглинання глюкози на 100 %. Дія всіх інгібіторів посилює поглинання глюкози тканиною неокортекса на 105 %. Внесення в інкубаційне середовище тканини неокортекса 24-місячних щурів галопеміда, перед додаванням суми інгібіторів метаболізму СФЛ, редукує активацію ФЛД і пригнічує стимульоване інсуліном поглинання глюкози (рис. 14).

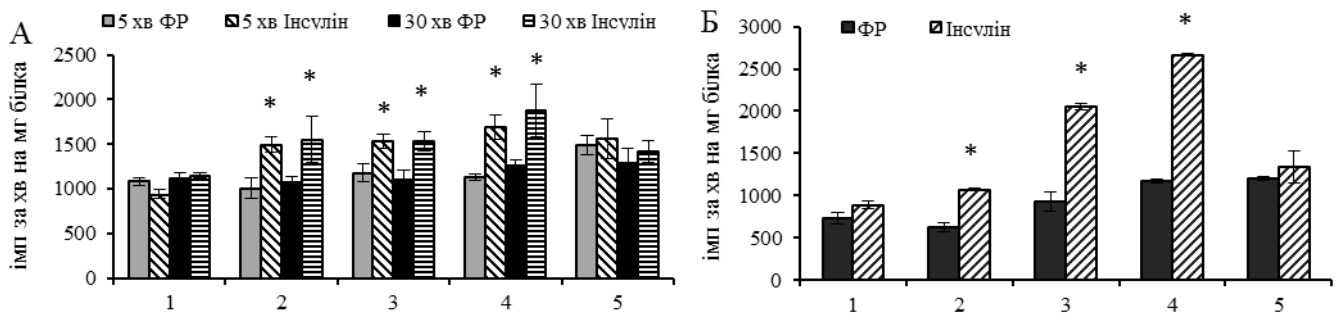


Рис. 14 Вплив інгібіторів метаболізму СФЛ і галопеміда на індукцію інсуліном активації ФЛД (А) і поглинання глюкози (Б) в неокортексі 24-місячних щурів

Примітки: 1) 1 - контроль; 2 - міріюцин; 3 - GW4869; 4 - сума інгібіторів; 5 - сума інгібіторів+галопемід (300 нМ); 2) \* - статистично значимо в порівнянні з 0,9 % NaCl,  $p \leq 0,05$

Модуляція вмісту ендогенних керамідів за допомогою специфічних інгібіторів метаболізму СФЛ і СФМаз у неокортексі 24-місячних щурів супроводжується відновленням відповіді нервової тканини до дії інсуліна, що проявляється в активації ФЛД-чутливої ланки сигнального каскаду гормону, а також посиленні поглинання глюкози тканиною.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі доведено, що ФЛД-залежна ланка сигнального каскаду інсуліна поряд зі стимульованим гормоном поглинанням та запасанням глюкози є чутливою до вікового і експериментально індукованого підвищення рівня ендогенних керамідів. Крім того, встановлено, що ефективним засобом корекції порушення чутливості клітин до дії гормонального стимулу в старості є модуляція вмісту керамідів за допомогою інгібіторів обміну сфінголіпідів, які є фармакологічними препаратами.

1. У печінці і м'язах, а також у неокортексі молодих статевозрілих щурів під дією інсуліна відбувається активація ФХ-специфічної ФЛД. Пригнічення активності даного ферменту за допомогою інгібіторів ФІЗ-кінази (вортманіна і LY294002) і інгібіторів Akt/ПКВ (АП7Гл і ЛЮ7Гл) свідчить про те, що активація інсулін-залежної ФЛД здійснюється послідовно від ключових учасників сигнального каскаду інсуліна, а саме ФІЗ-кінази і Akt/ПКВ і знаходиться під їх контролем.

2. В процесі блокування специфічними інгібіторами активації інсуліном ФІЗ-кінази, ФЛД і Akt/ПКВ у клітинах печінки і неокортексі молодих щурів відбувається пригнічення ефектів інсуліна на метаболізм глюкози, що свідчить на користь ключової ролі ФЛД у реалізації дії гормону на процеси поглинання і запасання глюкози, поряд із ФІЗ-кіназою і Akt/ПКВ.

3. У старості спостерігається пригнічення активації ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна і інсулін-залежного поглинання глюкози і утворення глікогена як в печінці і м'язовій тканині, так і в нервовій тканині, яка також є чутливою до дії гормонального стимулу.

4. Додавання екзогенних попередників синтезу і накопичення цераміда – 16:0 і С2-цераміда, або індукторів накопичення СФЛ (паклітаксела або ДОХ) до культурального середовища, супроводжується посиленням утворення цераміда в гепатоцитах, м'язовій тканині і неокортексі молодих щурів. Пригнічення в даних умовах активації інсуліном ФЛД і процесів поглинання глюкози і утворення глікогена, свідчить про те, що ФЛД є ланкою чутливою до змін рівня церамідів в тканинах-мішенях дії інсуліна.

5. За допомогою специфічних інгібіторів синтезу СФЛ і СФМаз вперше встановлено, що 16:0 і С2-церамід підвищують в клітинах- і тканинах-мішенях вміст цераміда за рахунок активації його синтезу *de novo*, в той час як паклітаксел і ДОХ індукують утворення цераміда як шляхом синтезу, так і за рахунок активації СФМаз.

6. Введення інгібіторів синтезу СФЛ і СФМаз у середовище інкубування клітин і тканин з віковими, а також експериментально індукованими порушеннями чутливості клітин до дії інсуліна, супроводжується відновленням активації інсуліном ФЛД і процесів поглинання глюкози і утворення глікогена в клітинах- і тканинах-мішенях.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті, які входять до переліку фахових видань України*

1. Babenko N. A., **Kharchenko V. S.** Effects of aging and experimentally induced signal pathway modifications on insulin-induced changes of glucose metabolism in rat cerebral cortex // *Neurophysiology*. 2015. Vol. 47(1). P. 16–22. (SCOPUS).

2. Babenko N. A., **Kharchenko V. S.** Age-related changes in the phospholipase D-dependent signal pathway of insulin in the rat neocortex // *Neurophysiology*. 2013. Vol. 45(2). P. 120–127. (SCOPUS).

3. **Харченко В. С.** Влияние высококалорийной диеты и кверцетина на фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина в неокортексе молодых крыс //

Вісник Харків. нац. ун-ту імені В. Н. Каразіна. Сер.: біологія. 2012. Т. 15. № 1008. С. 41–49.

4. Бабенко Н. А., **Харченко В. С.** Роль церамидов в нарушении инсулинового сигналинга в диафрагме крыс в условиях *in vivo* и *in vitro* // Пробл. эндокрин. патол. 2009. № 1. С. 37–43.

*Статті, що входять до міжнародних наукометричних баз*

5. Babenko N. A., **Kharchenko V. S.** Effects of inhibitors of key enzymes of sphingolipid metabolism on insulin-induced glucose uptake and glycogen synthesis in liver cells of old rats // Biochemistry (Mosc). 2015. Vol. 80(1). P. 104–112. (SCOPUS, PubMed).

6. Babenko Natalia A. and **Kharchenko Vitalina S.** Modulation of insulin sensitivity of hepatocytes by the pharmacological downregulation of phospholipase D // International Journal of Endocrinology. 2015. Vol. 2015. V. 1-15. (SCOPUS, PubMed).

7. Babenko Nataliya A., Hassouneh Loay Kh. M., **Kharchenko Vitalina. S.**, Garkavenko Vladimir. V. Vitamin E prevents the age-dependent and palmitate-induced disturbances of sphingolipid turnover in liver cells // Age (Dordr). 2012. № 34. P. 905–915. (SCOPUS, PubMed). *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

8. Babenko N. A., **Kharchenko V. S.** Ceramides inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats // Biochemistry (Mosc). 2012. Vol. 77(2). P. 180–186. (SCOPUS, PubMed).

9. Babenko N. A., Semenova Ya. A., **Kharchenko V. S.** Effects of fat-enriched diet on the content of sphingolipids in the brain and on cognitive functions in old rats // Neurophysiology. 2009. Vol. 41(4). P. 258–263. (SCOPUS). *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

*Тези науково-практичних конференцій різного рівня*

10. Бабенко Н. А., Харченко В. С. Роль фосфолипазы Д в сигнальном каскаде инсулина // Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Тринадцяті Данилевські читання) : тези доп. наук.-практ. конф., 13-14 бер. 2014 р. Харків, 2014. С. 25–26.

11. **Харченко В. С.** Экспериментально индуцированные изменения сигналинга инсулина в гепатоцитах молодых крыс // Фізіол. журн. (Додаток). 2014 р. Т. 60, № 3. С. 148–149.

12. **Харченко В. С.**, Белый А. Н., Бабенко Н. А. Роль церамида в регуляции активности фосфолипазы Д при паклитаксел-индуцированной инсулинорезистентности // The Ukrainian biochemical journal 2014. Vol. 86, N 5(Supplement 1). С. 216. *(Здобувач брав участь у постановці модельного експерименту, заборі біологічного матеріалу, проводив біохімічні дослідження, здійснював статистичний аналіз одержаних даних, брав участь у обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

13. Стороженко Г. В., **Харченко В. С.**, Бабенко Н. А. Церамид и фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина // Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Дванадцяті Данилевські читання) : тези доп. наук.-практ. конф., 14-15 бер. 2013 р. Харків, 2013. С. 130–131. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проводив біохімічні дослідження, здійснював статистичний аналіз одержаних даних, брав участь у обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

14. Babenko N. A., **Kharchenko V. S.** Ceramide synthesis de novo involved in insulin signaling disruption and insulin resistance development at old age // III International Symposium Intracellular signaling and bioactive molecules design : abstr. Internat. conf., 17-23 sept 2012. Lviv, Ukraine, 2012. P. 134.

15. **Харченко В. С.**, Тимофійчук О. А. Возрастные особенности инсулин-индуцированного поглощения глюкозы в тканях-мишенях // Ендокринна патологія у віковому аспекті : тези доп. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 1-2 лист. 2012 р. Харків, 2012. С. 87–88. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

16. **Харченко В. С.** Фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина в неокортексе крыс. возрастные и индуцированные изменения // Биологические механизмы старения : тезисы докл. IX междунар. симп., 16-19 мая 2012 р., Харьков, 2012. С. 63–64.

17. **Харченко В. С.** Роль церамидов в нарушении передачи фосфолипаза Д-зависимого сигнала инсулина в неокортексе крыс // Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Одинадцяті Данилевські читання) : тези доп. наук.-практ. конф., 1-2 бер. 2012 р. Харків, 2012. С. 137-138.

18. **Харченко В. С.** Активация инсулином фосфолипазы Д в гепатоцитах крыс. возрастные и индуцированные церамидом и пальмитиновой кислотой изменения // Биологические механизмы старения : тезисы докл. IX междунар. симп., 26-29 мая 2010 г. Харьков, 2010. С. 28–29.

19. Бабенко Н. А., **Харченко В. С.** Возрастные и индуцированные церамидом и пальмитиновой кислотой изменения сигналинга инсулина в гепатоцитах крыс // Проблемні питання ендокринології у віковому аспекті : тези доп. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 29-30 жовт. 2009 р. Харків, 2009. С. 16–17.

20. Бабенко Н. А., **Харченко В. С.** Роль церамида в регуляции активности фосфолипазы Д и модуляции состояния инсулинорезистентности // Патологія. 2008. Т. 5, № 2. С. 85.

21. Куликова (**Харченко**) В. С. Содержание липидов и индукция инсулином обмена ФХ и фосфатидилэтаноламина в коре головного мозга молодых крыс в условиях высококалорийного рациона и введения кверцетина // Фундаментальна та клінічна ендокринологія : проблеми, здобутки, перспективи (Сьомі Данилевські читання): тези доп. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 21-22 лют. 2008 р. Харків, 2008. С. 97.

22. Куликова (**Харченко**) В. С., Никитина И. В. Возрастные особенности индукции инсулином фосфолипазы Д в коре головного мозга крыс. Влияние кверцетина на сигналинг инсулина в старости // Биологические механизмы старения

: тезисы докл. VIII междунар. симп., 21-24 мая 2008 г. Харьков, 2008. С. 34. *(Здобувач брав участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

*Статті, що додатково відображають зміст дисертації*

23. Бабенко Н. А., Белый А. Н., **Харченко В. С.** Роль керамидов с различной длиной ацильной цепи в нарушении функционального состояния клеток печени // Таврич. мед.-биол. вестник. 2013. Т. 16. № 1. С. 29–34. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

*Електронне видання*

24. **Харченко В. С.**, Стороженко Г. В. Влияние насыщенных жиров диеты на содержание липидов и регуляцию инсулином фосфолипазы Д в тканях крыс // [Электронный ресурс] Research.ru. 2014. № 1. С. 1-6. Дата обновления: 20.05.2014. URL: <http://dx.doi.org/10.13070/rs.ru.1.815>. (дата обращения: 21.04.2016). *(Здобувач брав участь в плануванні та самостійно виконував експериментальну частину роботи, здійснював статистичний аналіз даних, оформлював одержані дані у формі статті).*

## АНОТАЦІЯ

**Харченко В. С. Роль сфінголіпідів в модуляції фосфоліпаза Д-залежного сигналінга інсуліна в старості. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна МОН України, Харків, 2018.

Наведено результати дослідження деяких особливостей регуляції інсуліном фосфатидилхолін (ФХ)-залежної фосфоліпази (ФЛД) і обміну глюкози в клітинах печінки, м'язовій тканині і неокортексі щурів лінії Вістар у процесі старіння. За допомогою інгібіторів фосфатидилінозитол-3-кінази (ФІЗ-кінази) (вортманіна, LY294002), Akt/протеїнкінази В (апігенін-7-глюкозида та лютеолін-7-глюкозида) та ФЛД (галопеміда) встановлено, що ФЛД є компонентом сигнального каскаду інсуліна і знаходиться під контролем ФІЗ-кінази і Akt/ПКВ, а також приймає участь у регуляції процесів обміну глюкози у гепатоцитах та неокортексі щурів. В умовах вікового підвищення рівня внутрішньоклітинних керамідів відбувається пригнічення індукованої інсуліном активності ФЛД поряд зі стимульованим гормоном обміном глюкози в клітинах печінки, діафрагмі і неокортексі щурів. При моделюванні підвищеного рівня ендогенних керамідів за допомогою пальмітинової кислоти і С2-цераміда, або паклітаксела або доксорубіцину відбувається пригнічення активації інсуліном ФЛД і процесів поглинання глюкози в тканинах-мішенях дії гормону. За допомогою специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів (міріюцина, фумонізина В1) та сфінгомієліназ (СФМаз) (іміпраміна, GW4869) встановлено, що пальмітинова кислота і С2-церамід індукують синтез ендогенного

цераміда *de novo*, а доксорубіцин і паклітаксел підвищують вміст сфінголіпідів як шляхом синтезу *de novo*, так і активуючи СФМаз. Використання суміші інгібіторів синтезу сфінголіпідів і СФМаз сприяє відновленню активації інсуліном ФЛД, процесів поглинання глюкози і утворення глікогена знижуючи рівень ендogenousного цераміда і нормалізуючи чутливість клітин-мішеней до дії гормону.

**Ключові слова:** церамід, сфінголіпіди, фосфоліпаза Д, інсулін, старіння, гепатоцити, неокортекс, діафрагма.

## АННОТАЦИЯ

**Харченко В. С. Роль сфинголипидов в модуляции фосфолипаза Д-зависимого сигналинга инсулина в старости. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина МОН Украины, Харьков, 2018.

Приведены результаты исследования некоторых особенностей регуляции инсулином фосфатидилхолин (ФХ)-зависимой фосфолипазы (ФЛД) и обмена глюкозы в клетках печени, мышечной ткани и неокортексе крыс линии Вистар в старости. С помощью ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИЗ-киназы) (вортманнина, LY294002), Akt/протеинкиназы В (апигенин-7-глюкозида и лютеолин-7-глюкозида) и ФЛД (галопемида) установлено, что ФЛД является компонентом сигнального каскада инсулина и находится под контролем ФИЗ-киназы и Akt/ПКВ, а также принимает участие в регуляции процессов обмена глюкозы в гепатоцитах и неокортексе крыс. В условиях возрастного повышения уровня внутриклеточных церамидов происходит подавление активированной инсулином ФЛД наряду со стимулированным гормоном обменом глюкозы в клетках печени, диафрагме и неокортексе крыс. При моделировании повышенного содержания эндогенных церамидов с помощью пальмитиновой кислоты и С2-церамида, или паклітаксела, или доксорубіцину происходит подавление активации инсулином ФЛД и процессов поглощения глюкозы в тканях-мишенях действия гормона. С помощью специфических ингибиторов синтеза сфинголипидов (мириоцина, фумонизина В1) и сфингомиелиназ (СФМаз) (имипрамина, GW4869) установлено, что пальмитиновая кислота и С2-церамид усиливают синтез эндогенного церамида *de novo*, а доксорубіцин и паклітаксел повышают содержание сфинголіпідів как путем синтеза *de novo*, так и активируя СФМазы. Использование смеси ингибиторов синтеза сфинголипидов и СФМаз способствует восстановлению активации инсулином ФЛД, процессов поглощения глюкозы и образования глікогена, снижая уровень эндогенного церамида и нормализуя чувствительность клеток-мишеней действия гормона.

**Ключевые слова:** церамид, сфинголипиды, фосфолипаза Д, инсулин, старение, гепатоциты, неокортекс, диафрагма.



**ABSTRACT**

**Kharchenko V. S. Role of sphingolipids in the modulation of phospholipase D-dependent insulin signaling in old age. – Qualification scientific paper, manuscript.**

Dissertation for the candidate of Biological Sciences degree in specialty: 03.00.04 - biochemistry. – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2018.

In the present work the functions and regulation of insulin-induced phospholipase D (PLD) were investigated in old age and under experimental changes of hormonal sensitivity of the target cells and tissues. The experimental and age-dependent changes of PLD activation, glucose uptake and storage were modulated by inhibitors of sphingolipid metabolism.

The activation of PC-specific PLD by insulin in classical target tissues (liver and muscles) and novel target (neocortex) was established. Halopemide, an inhibitor of PLD, suppressed the activity of PLD and significantly reduced the glucose uptake and the glycogen synthesis activated by insulin in hepatocytes. The insulin-induced activation of PLD was blocked by specific inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-kinase) wortmannin and LY294002 and by the inhibitors of Akt/protein kinase B (Akt/PKB) apigenin-7-glucoside and luteolin-7-glucoside. These results indicated that PLD is activated downstream P3-kinase and Akt/PKB. Regulation of PLD activity and glucose uptake and storage by insulin in primary hepatocytes was sensitive to the ceramide, the antagonist of P3-kinase/Akt/PKB-signaling pathways.

The sensitivity of the PLD to the insulin was decreased in hepatocytes, diaphragm tissue and neocortex of 24-month-old rats by elevated ceramide level. A high fat saturated diet induced the synthesis of free fatty acids and their derivatives such as DAG, TAG and ceramide in the diaphragm, liver and neocortex of 3-month-old rats. There were found disturbances in PLD activation by insulin in young rats caused by high-fat diet induced ceramide accumulation.

The endogenous ceramide accumulation and the suppression of activation PLD and glucose metabolism by insulin in young rat muscle tissue, liver cells and neocortex were found by modeling of the impaired sensitivity of the target tissues to the action of insulin with palmitic acid, C2-ceramide, cytotoxic drugs – doxorubicin and paclitaxel.

Using specific inhibitors of the sphingolipid synthesis (myriocin, fumonisins B1) and sphingomyelinase (SPMase) activity (imipramine, GW4869) it was determined that palmitic acid and C2-ceramide induce the endogenous ceramide *de novo* synthesis, while doxorubicin and paclitaxel increase the sphingolipid content by *de novo* synthesis and SPMase activation. The combination of inhibitors for both SPMase and sphingolipid synthesis promotes recovery of the insulin dependent PLD activation, glucose uptake and glycogen formation through the downregulation of endogenous ceramide levels accompanied with normalization of the target cells and tissues sensitivity for the hormonal action.

**Key words:** ceramide, sphingolipids, phospholipase D, insulin, aging, hepatocytes, neocortex, diaphragm.